

Legionella 属菌に対する TE-031の抗菌作用

藪内英子・甲畑俊郎・池戸正成

岐阜大学医学部微生物学講座

Erythromycin(EM)から合成された新しいマクロライド系抗生物質 TE-031の *Legionella* 属菌に対する *in vitro* と *in vivo* の抗菌力を EM および Josamycin(JM)を対照薬として比較した。*Legionella* 属10菌種79株に対する EM と JM の90% MIC(minimum inhibitory concentration, MIC₉₀)がそれぞれ0.2と0.78 μg/mlであるのに対して, TE-031のそれは ≤0.05 μg/ml と優れていた。*L. pneumophila* serogroup 1の2株, GIFU 9888と9799を用いて行ったモルモットでの感染治療実験で, TE-031の50%有効量(ED₅₀)はそれぞれ5.36と7.07 mg/animalであったが, EM では160と>320, JM では>160 mg/animal と大差を示した。マクロファージの実験では細胞内菌数7×10⁴/mlを2×10²/mlに低下させる薬剤濃度はTE-031, EM, JMでそれぞれ0.005, 0.01および0.05 μg/mlであったが, TE-031, EMともに0.05 μg/mlで1~2×10² cfu/mlの細胞内生菌が残存した。

TE-031は Erythromycin(EM)と同じ14員環骨格を持つマクロライド系抗生物質で, 大正製薬総合研究所で新たに合成された。化学名は(-)-(3R,4S,5S,6R,7R,9R,11R,12R,13S,14R)-4-[(2,6-dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl-α-L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-14-ethyl-12,13-dihydroxy-7-methoxy-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-6-[[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)-β-D-xylo-hexopyranosyl]oxy]oxacyclotetradecane-2,10-dioneであり, その化学構造は Fig. 1 に示す。TE-031ははじめマクロライド系薬剤は好気性グラム陽性菌, 嫌気性菌, マイコプラズマおよび *Legionella* を含む一部の好気性グラム陰性菌に抗菌作用のあることが知られている。今回 *Legionella* 属10菌種の基準株と各血清群のリファレンス株, 日本国内での臨床および環境分離株に対する抗菌作用, モルモット感染治療実験, モルモット腹腔マクロファージ感染治療実験を行ったので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

TE-031は大正製薬から提供された粉末を用いた。対照薬剤として用いた Erythromycin(EM)と Josamycin(JM)も大正製薬から分与された。

2. 使用菌株

抗菌作用の測定には *L. pneumophila* を含む10菌種の命名上の基準株と *L. pneumophila* の1~8血清群および *L. longbeachae* の1, 2血清群のリファレンス株の19株, 日本国内でのヒト由来8株, 冷却塔などの環境由来52株の計79株を用いた(Table 1)。

モルモット感染治療実験には激症肺炎患者由来の GIFU 9888株(大阪通信病院株)¹⁾と GIFU 9799株(九大病

院株)²⁾を, またモルモットマクロファージ感染治療実験には9888株を用いた。モルモットに対する50%致死量は, 9888株では1.4×10⁷ cfu/animal, 9799株では6.5×10⁶ cfu/animalであった。

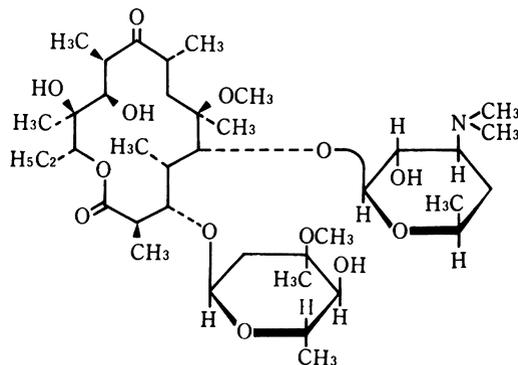
3. 実験方法

1) 抗菌力測定

使用した79菌株に対する3薬剤の最小発育阻止濃度は buffered charcoal yeast extract(BCYE)寒天培地を用い, 日本化学療法学会標準法³⁾に準じ寒天平板希釈法で測定した。被検菌はBCYE寒天平板に35℃, 72時間培養したものを Mueller-Hinton brothに10⁶ cfu/mlになるよう懸濁し, ミクロプランター(佐久間製作所)を用い, 薬剤含有培地に約5 μl接種し35℃, 72時間培養後, 被検菌の発育の見られない最小薬剤濃度を minimum inhibitory concentration(MIC)とした。

2) モルモット感染治療実験

Fig. 1 Chemical structure of TE-031



L. pneumophila 9888株と9799株(いずれも血清群1)はBCYE 寒天培地で35°C, 72時間培養したものを滅菌磷酸緩衝食塩水に懸濁し, 前者は 1.3×10^8 , 後者は 8.8×10^7 cfu/mlとした。

3週齢のハートレイ系モルモット雌, 体重200~250 gの10頭を1群とし, 被検菌液の各1 mlを腹腔内に接種した。接種1時間後に治療群には5%アラビアゴムに懸濁した各薬剤を, ラット用ゾンデを用いて, 胃内に1回経口投与した。モルモット1頭当たりの薬剤投与量はTE-031は1.25~20 mgの5段階, EMは40~320 mgの4段階, JMは40~160 mgの3段階とした。対照群にはア

ラビアゴム液のみを投与した。その後9~10日目まで観察して生死を判定し, 各薬剤の50%有効量(ED₅₀)を求めた。算定には, VAN DER WAERDEN 法⁴⁾を用いた。

3) マクロファージ内抗菌作用

モルモット腹腔マクロファージの誘導には, proteose peptone(Difco)と澱粉の各5%混合液7 mlを腹腔内に注射した。24時間後にヘパリン加ハanks液10 mlを腹腔内に注入したのち動物を屠殺し腹腔液を回収し, 遠心洗浄し約 10^6 cells/mlになるよう10%ウシ胎仔血清加RPMI 1640に再懸濁し, 24穴のマイクロプレートの各穴に1 mlずつ分注した。培養1時間後に1回洗浄して浮

Table 1 The 79 strains of 10 *Legionella* species used

The 19 type and reference strains		
GIFU 9134 [†]	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	ATCC 33152
GIFU 9135	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	ATCC 33153
GIFU 9136	<i>L. pneumophila</i> serogroup 2	ATCC 33154
GIFU 9137	<i>L. pneumophila</i> serogroup 3	ATCC 33155
GIFU 9138	<i>L. pneumophila</i> serogroup 6	ATCC 33215
GIFU 9139	<i>L. pneumophila</i> serogroup 5	ATCC 33216
GIFU 9140 [†]	<i>L. bozemani</i>	ATCC 33217
GIFU 9141 [†]	<i>L. micdadei</i>	ATCC 33218
GIFU 9142 [†]	<i>L. gormanii</i>	ATCC 33297
GIFU 9244	<i>L. dumoffii</i>	ATCC 33343
GIFU 9245 [†]	<i>L. longbeachae</i> serogroup 1	ATCC 33462
GIFU 9246	<i>L. pneumophila</i> serogroup 4	ATCC 33156
GIFU 9247 [†]	<i>L. dumoffii</i>	ATCC 33279
GIFU 10061 [†]	<i>L. oakridgensis</i>	CDC OR 10
GIFU 10062 [†]	<i>L. wadsworthii</i>	CDC 81-716
GIFU 10063 [†]	<i>L. feeleei</i>	CDC WO-44G
GIFU 10064	<i>L. pneumophila</i> serogroup 7	CDC Chicago 8
GIFU 10065	<i>L. pneumophila</i> serogroup 8	CDC Concord 3
GIFU 10066	<i>L. longbeachae</i> serogroup 2	CDC Tucker-1
The 8 strains of human origin ^a		
GIFU 9799	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	Kyushu Univ.
GIFU 9888	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	Osaka Teishin 2076
GIFU 10067	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	Nagasaki Univ. 80-045
GIFU 10068	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	Nagasaki Univ. 80-068
GIFU 10069	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	Nagasaki Univ. 82-231
GIFU 10073	<i>L. pneumophila</i> serogroup 3	Nagasaki Univ. 82-258
GIFU 10074	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	Nagasaki Univ. 83-275
GIFU 10075	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	Nagasaki Univ. 83-279
The 52 strains of environmental origin ^a		
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	25 strains
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 3	1 strain
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 4	1 strain
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 5	2 strains
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 6	1 strain
	<i>L. pneumophila</i> none ^b	22 strains

^a : Isolated in Japan

^b : Not agglutinable with antisera of *L. pneumophila* serogroups 1 through 6, inclusive

[†] : Type strain for the species

Fig. 3 Anti-*L. pneumophila* activity of TE-031

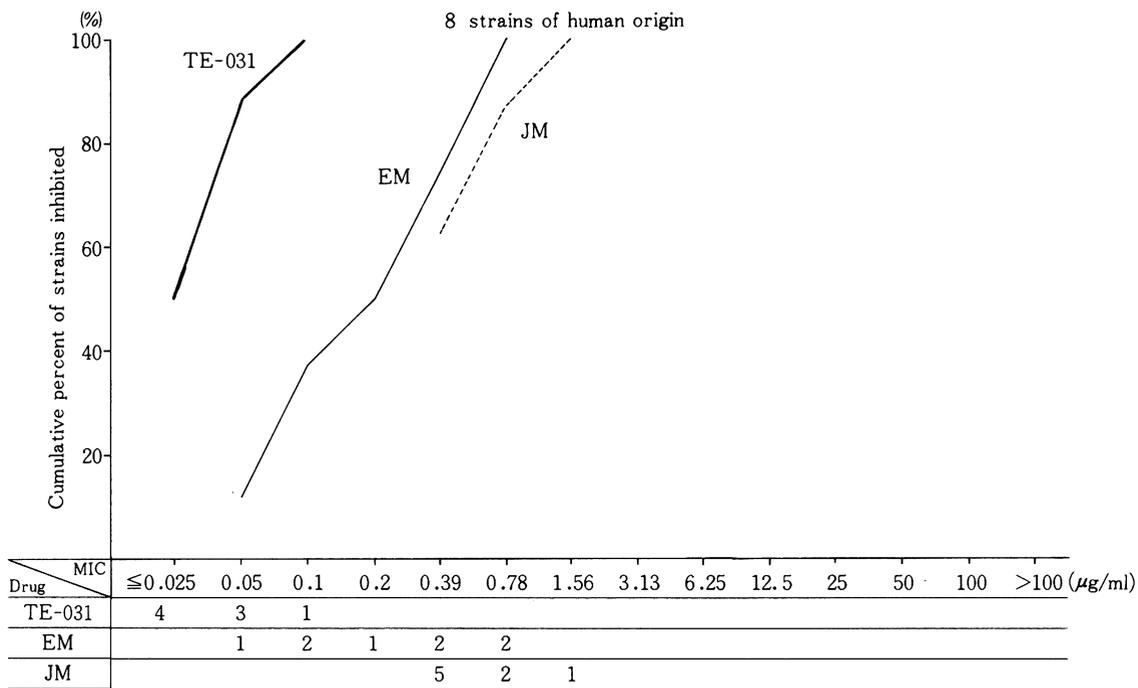


Fig. 4 Anti-*L. pneumophila* activity of TE-031

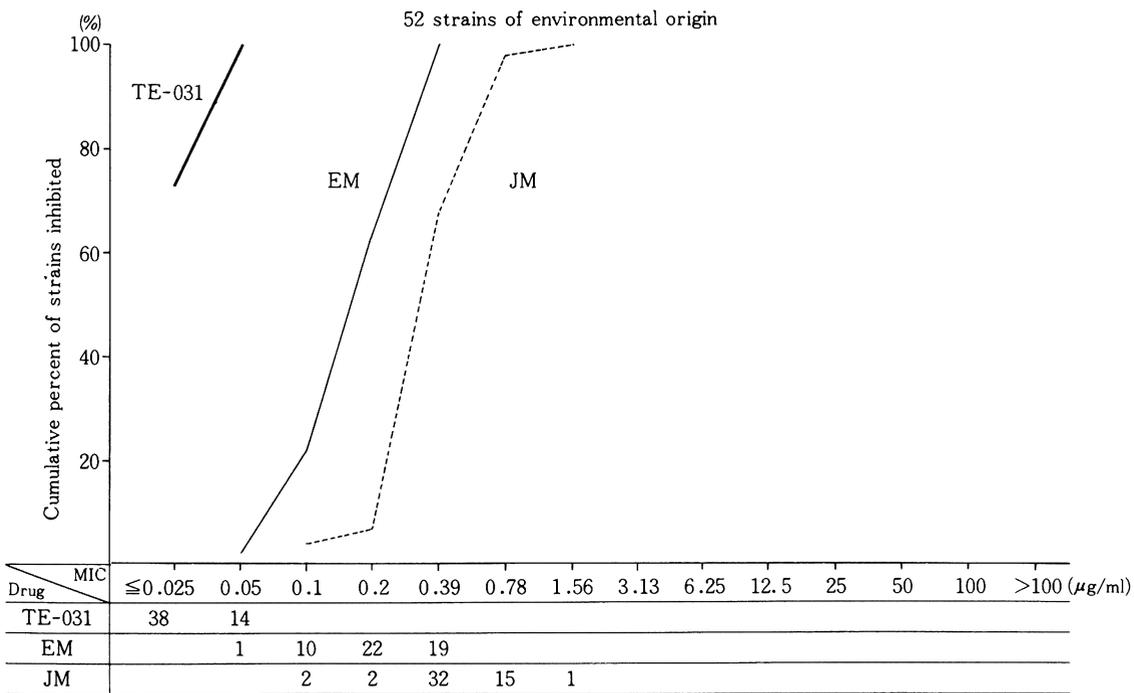


Fig. 5 Effect of TE-031 on guinea-pig experimental infection of *L. pneumophila* serogroup 1, GIFU 9888

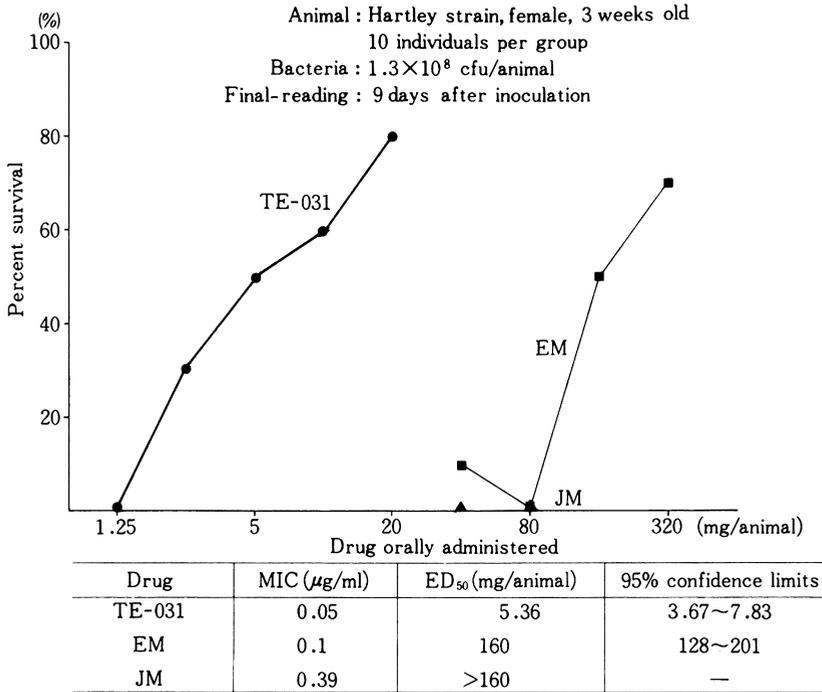
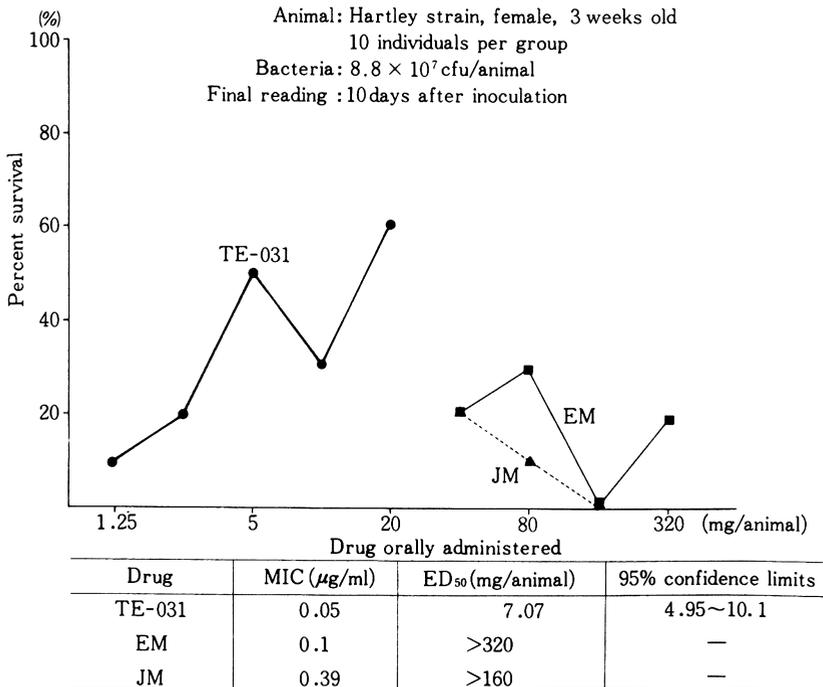


Fig. 6 Effect of TE-031 on guinea-pig experimental infection of *L. pneumophila* serogroup 1, GIFU9799



3. マクロファージ内抗菌作用

3.3×10^4 cfu/ml の *L. pneumophila* 9888株を接種したマクロファージ内の生菌数は、接種1時間後には 6.0×10^3 /mlと減少したが、薬剤を含まないRPMI 1640培地で培養を継続した場合、24時間後には 6.0×10^4 /mlとなった。抗菌剤を含まないRPMI 1640培地で9888株のみを培養したとき24時間後の生菌数は 6.9×10^4 /mlであった。培養24時間後にマクロファージ内生菌数を 2×10^2 /mlに低下させる薬剤濃度はTE-031, EM, JMでそれぞれ0.005, 0.01および0.05 μ g/mlであった。しかし、TE-031, EMともに0.05 μ g/mlで $1 \sim 2 \times 10^2$ cfu/mlの細胞内生菌が残存した(Table 2)。

Ⅲ. 考 察

Legionella 属菌は生体内ではマクロファージの細胞質内で増殖するため、動物細胞膜を通過しないペニシリン剤、セフェム剤、アミノグリコシド剤などが臨床効果を発揮し得ないことがよく知られている。そのため、これまではレジオネラ肺炎の治療薬としてEMが第一選択剤とされており、これにリファンピシン(RFP)やミノサイクリン(MINO)を併用する場合が多かった。しかしEMの誘導体であるTE-031は*Legionella* 属10菌種に対し*in vitro*で、*L. pneumophila* に対し*in vivo*でEM, JMより優れた抗菌活性を発揮した。このことは、*Legionella* 属菌79株に対する90% MIC値でTE-031はEMの4~8倍、JMの8~16倍有効であり、モルモットに対する*L.*

pneumophila 感染実験でのED₅₀でもTE-031はEM, JMと大差を示したことから明らかである。

YOSHIDA ら⁵⁾は、1~20 μ g/mlのEMを作用させた*L. pneumophila* 感染マクロファージ(マイクロプレートの穴1個あたり1mlの懸濁液)で、2日目に150~>220 cfuの生菌を回収している。我々は被検菌株に対するTE-031の細胞内有効量の下限を知る目的で0.05~0.0001 μ g/mlの薬剤を用いた。その結果0.005 μ g/mlのTE-031を含有する培地で24時間培養した後のマクロファージ内生菌数は、薬剤不含培地で培養した時のその約1/260に減少し、YOSHIDA らが1 μ g/mlのEMを用いて培養2日目に回収した生菌数とほぼ同等であった。一方我々は0.05 μ g/mlのEMを用いて24時間後に 1.8×10^2 /mlの生菌を回収したが、この値はYOSHIDA らが20 μ g/mlのEMを用いて2日目に回収した菌数とほぼ一致しており、薬剤濃度を上昇させることがこの培養期間内の細胞内生菌の排除につながらないことを示唆している。

Legionella の感染経路としては、この菌を内包したエロゾルが吸入されて肺胞内に到達し、感染早期に肺胞マクロファージと遭遇してその細胞質内で増殖し、宿主の条件によっては重篤な肺炎を惹起するのであろう。*In vitro*と*in vivo*での*Legionella* 属菌に対する優れた抗菌活性および培養マクロファージ内*L. pneumophila* 生菌数減少効果は、その著明な肺内蓄積と相まって、TE-031のレジオネラ肺炎に対する優れた治療効果を期待せしめる。

Table 2 Effect of TE-031 on the viable count of *L. pneumophila* serogroup 1 GIFU 9888 in cultured guinea-pig macrophages

Drug	Viable counts (cfu/ml) ^a at a presence of drug (μ g/ml)					
	0.05	0.01	0.005	0.001	0.0005	0.0001
TE-031	1.2×10^2	N.D.	2.3×10^2	2.7×10^4	6.0×10^4	7.2×10^4
EM	1.8×10^2	2.6×10^2	8.4×10^3	1.6×10^4	5.6×10^5	N.D.
JM	2.8×10^2	7.0×10^3	3.7×10^4	6.5×10^4	1.0×10^5	N.D.

^a : Determined at 24h incubation with drug-containing medium

Number of peritoneal macrophages : 9.4×10^5 /ml

Number of bacteria inoculated : 3.3×10^4 /ml

Intracellular viable counts in drug-free medium were 6.0×10^3 /ml at 1h and 6.0×10^4 /ml at 24h after inoculation, respectively

N.D. : Not done

文 献

1) 竹森紘一, 横田英子, 筒井俊治, 田邊シズエ, 奥田敬一: 気管支採痰による喀痰より分離された*Legionella pneumophila* の1例について。衛生検査

33: 672~674, 1984

2) 福本 晃, 桐島輝子, 名取弘道, 泉 好宣, 阿倉薫, 畠中光恵: 急性肺炎患者から分離された*Legionella pneumophila* について。衛生検査 33:

- 885~889, 1984
- 3) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度(MIC)の測定法再改定について。Chemotherapy 29 : 76~79, 1981
- 4) VAN DER WAERDEN, B. L. : Wirksamkeits und Konzentrationsbestimmung durch Tierversuche. Arch. Exp. Path. Pharmak. 195 : 389~412, 1940
- 5) YOSHIDA, S. ; Y. MIZUGUCHI : Antibiotic susceptibility of *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 in cultured guinea-pig peritoneal macrophages. J. Gen. Microbiol. 130 : 901~906, 1984

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TE-031(A-56268) AGAINST *LEGIONELLA* SPECIES

EIKO YABUUCHI, SHUNRO KOHBATA and MASANARI IKEDO

Department of Microbiology, Gifu University School of Medicine, Gifu, Japan

We studied the *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of TE-031(A-56268), a new macrolide antibiotic synthesized from erythromycin(EM), in comparison with those of EM and josamycin(JM).

The 90% minimum inhibitory concentration (MIC₉₀) of TE-031 against 79 strains of 10 *Legionella* species was ≤ 0.05 $\mu\text{g/ml}$, in contrast to those of EM and JM, which were 0.2 and 0.78 $\mu\text{g/ml}$. The 50% effective dose (ED₅₀) of TE-031 for guinea-pig intraperitoneal infections due to two *L. pneumophila* serogroup-1 strains, GIFU 9888 and GIFU 9799, were 5.36 and 7.07 mg/animal. In contrast, the ED₅₀s for the two strains were 160 and > 320 mg/animal of EM, and > 160 mg/animal of JM.

When cultured guinea-pig peritoneal macrophages were infected with *L. pneumophila* GIFU 9888, the drug concentration necessary to induce a 2-log decrease in intracellular viable counts was 0.005 $\mu\text{g/ml}$ in the case of TE-031, while those of EM and JM were 0.01 and 0.05 $\mu\text{g/ml}$. Intracellular bacteria of $1\sim 2 \times 10^2$ CFU/ml survived when 0.05 $\mu\text{g/ml}$ of TE-031 or EM was used.